昆 虫 学 报 *Acta Entomologica Sinica*, October 2012, 55(10): 1154 - 1160 ISSN 0454-6296

Cry1Fa 对 Cry1Ac 抗性棉铃虫的毒力评价

魏纪珍[1], 郭予元[1], 高希武[2], 张 涛[1,3], 梁革梅[1,*]

(1. 中国农业科学院植物保护研究所, 植物病虫害生物学国家重点实验室, 北京 100193;
2. 中国农业大学农学与生物技术学院昆虫学系, 北京 100193; 3. 广西大学农学院, 南宁 530004)

摘要: 为了防治多种鳞翅目害虫, 表达 Cry1Fa 的转基因玉米和棉花已在美国商业化种植。明确棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 对 Cry1Fa 与 Cry1Ac 的交互抗性及这两种杀虫蛋白之间的协同作用, 可以为表达 Cry1Fa + Cry1Ac 的转双价抗虫棉花的合理应用提供依据。本实验测定了 Cry1Fa 对棉铃虫敏感品系(96S)及用 Cry1Ac 筛选的抗性品系(BtR, 抗性倍数 2 194.15 倍)的毒力, 发现 Cry1Fa 对敏感棉铃虫的毒力远低于 Cry1Ac, LC_{50}值是 Cry1Ac 的 504.80 倍; 而且抗性品系 BtR 对 Cry1Fa 存在 19.98 倍的交互抗性。Cry1Fa 与 Cry1Ac 混用可以提高 Cry1Fa 毒杀敏感棉铃虫的效果, 尤其是 Cry1Fa 浓度较低时, 加入 Cry1Ac, 可以显著增加 Cry1Fa 的毒力; 但只有加入较高浓度的 Cry1Fa 时才能增加 Cry1Ac 的毒力。由于 BtR 品系已经对 Cry1Ac 产生抗性, Cry1Ac 对抗性棉铃虫的毒力明显降低; 在较高浓度的 Cry1Ac 中加入 Cry1Fa 可以显著增加棉铃虫的死亡率($P=0.0015$, $F=6.88$, $df=6$), 但最高死亡率仅为 58.33%。D-饱和最优试验的结果证实, Cry1Ac 对于敏感棉铃虫的死亡率的影响达到显著水平($t_1=13.76 > t_{0.05}$), Cry1Ac 与 Cry1Fa 的交互作用对毒力的影响也达到显著水平($t_{22}=2.42 > t_{0.05}$; $t_{11}=6.95 > t_{0.05}$; $t_{12}=3.43 > t_{0.05}$)。Cry1Ac 和 Cry1Fa 对抗性棉铃虫死亡率的影响都达到显著水平($t_1=3.03 > t_{0.05}$; $t_2=2.59 > t_{0.05}$), 但 Cry1Ac 是决定抗、感棉铃虫死亡率的关键因素; Cry1Ac 与 Cry1Fa 最佳浓度配比范围都是 1.41 ~ 2.10 μg/cm^2; 在抗性品系中, Cry1Ac 和 Cry1Fa 的交互作用不显著。所以, 尽管 Cry1F + Cry1A 作物扩大了杀虫谱, 但棉铃虫对这两种蛋白存在交互抗性, 而且这两种蛋白混用对治理抗 Cry1Ac 棉铃虫的效果不理想, 因此不建议在中国种植表达 Cry1F + Cry1A 的棉花。

关键词: 棉铃虫; Cry1Ac; Cry1Fa; 毒力; 交互抗性; 协同作用
中图分类号: Q965.9 **文献标识码**: A **文章编号**: 0454-6296(2012)10-1154-07

Evaluation of the toxicity of Cry1Fa to the Cry1Ac-resistant cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae)

WEI Ji-Zhen[1], GUO Yu-Yuan[1], GAO Xi-Wu[2], ZHANG Tao[1,3], LIANG Ge-Mei[1,*] (1. State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China; 2. Department of Entomology, College of Agronomy and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100193, China; 3. College of Agronomy, Guangxi University, Nanning 530004, China)

Abstract: Cry1Fa-expressing corn and cotton have been commercially planted in U. S in order to effectively control several Lepidoptera pests. Making clear the cross-resistance of cotton bollworms (*Helicoverpa armigera*) to Cry1Ac and Cry1Fa and the synergism between the two toxins could provide the theoretical bases for rationally applying Cry1Fa + Cry1Ac cotton. The toxicity of Cry1Fa to the susceptible strain (96S) and the resistant strain (BtR, selected by Cry1Ac, the resistance ratio was 2 194.15-fold) was tested in our study. The results showed that the toxicity of Cry1Fa was lower than Cry1Ac to 96S, the LC_{50} value of Cry1Fa was 504.80 times as high as that of Cry1Ac, and there was 19.98-fold cross-resistance to Cry1Fa in the Cry1Ac-resistant strain (BtR). Cry1Fa mixed with Cry1Ac could increase the toxicity of Cry1Fa against 96S, and especially when the concentration of Cry1Fa was low, the synergistic effect was significant. However, the toxicity of Cry1Ac could be improved just when being added with high-dose Cry1Fa. Because the BtR strain had resistance to Cry1Ac, the toxicity of Cry1Ac to BtR reduced obviously. Mixing Cry1Fa into high-dose Cry1Ac could increase the mortality of BtR ($P=0.0015$, $F=6.88$, $df=6$), but the highest mortality was only 58.33%. The results of the 2-

基金项目: 国家转基因生物新品种培育重大专项课题(2011ZX08011-002)
作者简介: 魏纪珍, 女, 1986 年生, 河南驻马店人, 硕士研究生, 研究方向为昆虫生理生化与分子生物学, E-mail: weijizhen1986@163.com
* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: gmliang@ippcaas.cn
收稿日期 Received: 2012-07-17; 接受日期 Accepted: 2012-10-08

D-optimum orthogonal design experiment showed that Cry1Ac had significant effect to control the susceptible cotton bollworm ($t_1 = 13.76 > t_{0.05}$), and the influence of interactive effect between Cry1Ac and Cry1Fa on toxicity was also significant ($t_{22} = 2.42 > t_{0.05}$; $t_{11} = 6.95 > t_{0.05}$; $t_{12} = 3.43 > t_{0.05}$). Cry1Ac and Cry1Fa had significant effect against the resistant cotton bollworm ($t_1 = 3.03 > t_{0.05}$; $t_2 = 2.59 > t_{0.05}$), but Cry1Ac was the key determinant for the mortality of the susceptible and resistant cotton bollworms. The optimum concentration ranges of Cry1Ac and Cry1Fa were 1.41 – 2.10 μg/cm^2. However, the interactive effect between Cry1Ac and Cry1Fa was not significant in the BtR resistant strain. Thus, although the crops expressing Cry1F + Cry1A can expand the spectrum of killing insects, however, because of the cross-resistance and the undesirable effect in managing the Cry1Ac-resistant bollworm, transgenic Cry1F + Cry1A cotton is not recommended for planting in China.

Key words: *Helicoverpa armigera*; Cry1Ac; Cry1Fa; toxicity; cross resistance; synergism

表达 Bt(苏云金芽孢杆菌 *Bacillus thuringiensis*)杀虫蛋白的转基因植物不但能有效地防治害虫，而且对环境友好(Betz *et al.*, 2000)。第一代 Bt 棉(表达的是 Cry1Ac 蛋白)的广泛应用不仅有效地控制了棉铃虫 *Helicoverpa armigera* (Hübner)等鳞翅目害虫的为害(Kleter *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2008)，还减少了化学农药的使用，降低了环境污染(Wang *et al.*, 2007; Choudhary and Gaur, 2010; Brookes and Barfoot, 2010)。然而大面积持续地种植 Bt 棉花，抗性问题已成为影响 Bt 棉花可持续利用的关键因素(James, 2010)。Tabashnik 和 Carrière(2010)报道，印度从 2002 年开始种植第一代转基因棉花，到 2009 年田间的红铃虫 *Pectinophora gossypiella* 就已对 Cry1Ac 产生了抗性。

目前有效的抗性治理策略主要有高剂量/庇护所策略、新毒素策略和转多价基因策略(Bates *et al.*, 2005)。Cry1Fa 同 Cry2A 和 Vip 类一起作为第二代重要的 Bt 毒素，在增强杀虫活性、抗性治理、扩大杀虫谱等方面起到了重要的作用(Gouffon *et al.*, 2011; Yu *et al.*, 2011)。现在已经商业化生产的转双价基因棉花主要有：同时表达 Cry1Ac + Cry2Ab 蛋白、Cry1A + Cry1Fa 蛋白、Vip3A + Cry1Ab 蛋白等(Yu *et al.*, 2011)。靶标昆虫对于表达的两种蛋白是否存在交互抗性是转双价抗虫棉花长期应用的关键。虽然，有研究表明 Cry1Ac 和 Cry1Fa 在烟芽夜蛾 *Heliothis virescens* (L.) BBMV 上有不同的受体(Jurat-Fuentes and Adang, 2001)，但是 Cry1Ac 和 Cry1Fa 在结构域Ⅱ毒素的结合和活性区域存在 40% 的同源性(Granero *et al.*, 1996; Rajamohan *et al.*, 1996; Ballester *et al.*, 1999)，而且甜菜夜蛾对 Cry1Ac 和 Cry1Fa 表现出高水平的交互抗性(Tabashnik *et al.*, 1997, 2000)。Jurat-Fuentes 等(2002)发现 Cry1Fa 和 Cry1Ac 在抗 Cry1Ac 的棉铃虫品系膜囊泡上结合量的减少与抗性产生有关；而且 Hernández 和 Ferré(2005)用 ^{125}I 标记测定的方法证明 Cry1Fa 与 Cry1Ac 在棉铃虫中肠上存在相同的受体。

主要用于防治鳞翅目害虫的 Cry1Fa + Cry1A 转基因玉米，从 2001 年开始在美国商业化种植。表达 Cry1Fa 和 Cry1A 的转基因棉花也于 2004 年在美国商业化种植(James, 2010)。在中国，玉米是转基因棉花种植时棉铃虫的重要天然庇护所，因此评价棉铃虫对 Cry1Fa 与 Cry1Ac 的交互抗性及两种蛋白的协同作用，对未来 Cry1Fa + Cry1A 转基因玉米和棉花的推广具有重要影响。本研究测定了抗 Cry1Ac 的棉铃虫对 Cry1Fa 的交互抗性，比较了 Cry1Ac 和 Cry1Fa 混用在抗性及敏感棉铃虫上的增效作用，评价了两种蛋白对敏感、抗性棉铃虫品系的决定作用，为我国转双价基因棉花的合理应用提供依据。

1　材料与方法

1.1　供试棉铃虫

棉铃虫敏感品系(96S)：1996 年采自河南新乡棉田，在室内用人工饲料饲养至今，温度 26 ± 1℃，相对湿度 60% ~ 85%，光周期 16L∶8D，未接触任何 Bt 毒素和杀虫剂。饲养方法参照梁革梅等(1999)。

棉铃虫抗性品系(BtR)：用 Cry1Ac 蛋白在室内筛选 129 代，温度 26 ± 1℃，相对湿度 60% ~ 85%，光周期 16L∶8D，经过与 96S 品系多次的回交、再筛选获得的近等基因抗性品系。筛选方法参照 Liang 等(2008)。

1.2　Bt 蛋白的提取

Cry1Ac 和 Cry1Fa 菌株由中国农业科学院植物保护研究所生物技术组提供，利用 Staples 等(2001)提取蛋白。

1.3　生物测定方法

采用表面涂抹方法进行生物测定(Hernández-Rodríguez *et al*., 2008)。即先在 24 孔板中先加入约 1 mL 未凝固的人工饲料，待饲料凝固后，再加入不同浓度的 Bt 蛋白(60 μL/孔)，加入后轻轻晃动 24 孔板，使药液均匀地平铺在饲料表面上。每个处理接 24 头初孵幼虫，设 3 次重复，第 7 天检查幼虫死亡情况。设 Na_2CO_3 缓冲液为对照。

1.3.1　交互抗性测定：分别测定 Cry1Ac 和 Cry1Fa 对 96S 和 BtR 的毒力，利用 DPS 软件求出毒力回归式、斜率和致死中浓度(LC_{50})，用抗性品系的 LC_{50} 除以敏感品系的 LC_{50} 得到抗性品系的抗性倍数。

1.3.2　Cry1Ac 和 Cry1Fa 混用的增效作用：Cry1Ac 和 Cry1Fa 分别以 0, 0.02, 0.06, 0.18, 0.53, 1.59 和 4.76 μg/cm^2 的浓度交叉混合。分别测定不同蛋白浓度组合对 96S 和 BtR 棉铃虫幼虫的死亡率。

1.3.3　Cry1Ac 和 Cry1Fa 混用的最优组合分析：利用 D-饱和最优回归设计，针对 Cry1Ac 和 Cry1Fa 两个因素，按表 1 的浓度设计 3 次重复的饱和试验，制定“206”表进行试验，测定不同组合浓度下抗、感棉铃虫幼虫的死亡率。根据结果建立回归方程，并进行因子主次分析、单因子的影响、最优浓度配比分析等(丁希泉, 1986; 张永成, 1997)。

表 1　Cry1Ac 和 Cry1Fa 的编码及浓度设置

Table 1　The codes and concentration of Cry1Ac and Cry1Fa

序号 No.	Cry1Ac		Cry1Fa	
	编码 Code	浓度 Concentration (μg/cm^2)	编码 Code	浓度 Concentration (μg/cm^2)
1	−1	0	−1	0
2	1	4.760	−1	0
3	−1	0	1	4.760
4	−0.1315	2.061	−0.1315	2.061
5	1	4.760	0.3945	3.307
6	0.3945	3.307	1	4.760

1.4　数据统计与分析

试验数据利用 DPS 进行数据分析。将死亡率进行反正弦转化后进行 ANOVA 数据分析，用 Tukey 法进行多重比较。在 D-饱和试验中，将死亡率转化为几率值后进行数据分析。

2　结果与分析

2.1　棉铃虫对 Cry1Ac 和 Cry1Fa 的交互抗性

由表 2 可以看出，Cry1Fa 对棉铃虫敏感品系 96S 的 LC_{50} 是 12.62 μg/cm^2，Cry1Ac 的毒力是 Cry1Fa 的 504.80 倍。棉铃虫抗性品系 BtR 已经对 Cry1Ac 产生了 2 194.15 倍的抗性；同时，Cry1Fa 的杀虫效果也明显降低，抗 Cry1Ac 棉铃虫对其存在 19.98 倍的交互抗性。

2.2　Cry1Ac 和 Cry1Fa 在抗、感棉铃虫上的增效作用

除 0.53 μg/cm^2 Cry1Fa + 0.020 μg/cm^2 Cry1Ac 混用条件下棉铃虫敏感品系 96S 的死亡率(47.22%)显著低于对照外(P = 0.0001, F = 39.14, df = 6)，其他混合情况下的死亡率都高于单用 Cry1Fa 时的死亡率。因此，Cry1Fa 与 Cry1Ac 混用可以提高 Cry1Fa 毒杀敏感棉铃虫的效果，尤其是 Cry1Fa 浓度较低时，增效显著。当 Cry1Ac 的浓度大于 1.59 μg/cm^2，死亡率接近 100%，加入 Cry1Fa 增效不显著；只有 Cry1Ac 浓度较低时，加入较高浓度的 Cry1Fa 才能增加 Cry1Ac 的毒力(图 1: A)。

由于棉铃虫抗性品系 BtR 已经对 Cry1Ac 产生抗性，Cry1Ac 对棉铃虫抗性品系的毒力明显降低，此时，在较高浓度的 Cry1Ac 中加入高于 0.18 μg/cm^2 浓度的 Cry1Fa 可以明显地增加棉铃虫的死亡率(P = 0.0015, F = 6.88, df = 6)(图 1: B)。即使二者以最高浓度混用，死亡率也仅为 58.33%，略高于 4.76 μg/cm^2 Cry1Fa 单用时的死亡率，差异不

表 2　Cry1Ac 和 Cry1Fa 对抗、感棉铃虫的毒力比较

Table 2　Toxicity of Cry1Ac and Cry1Fa toxins to resistant and susceptible *Helicoverpa armigera*

品系 Strains	Cry1Ac			Cry1Fa		
	斜率 ± *SE* Slope ± *SE*	LC_{50} (95% CL) (μg/cm^2)	RR	斜率 ± *SE* Slope ± *SE*	LC_{50} (95% CL) (μg/cm^2)	RR
96S	0.87 ± 0.11	0.025 (0.009 − 0.047)	1.00	0.93 ± 0.11	12.62 (0.934 − 1.272)	1.00
BtR	0.65 ± 0.19	53.99 (8.991 − 845.500)	2 194.15	0.67 ± 0.14	252.21 (105.432 − 568.470)	19.98

96S：敏感品系 Susceptible strain；BtR：抗 Cry1Ac 的抗性品系 Resistant strain selected with Cry1Ac. RR：抗性倍数 Resistance ratio.

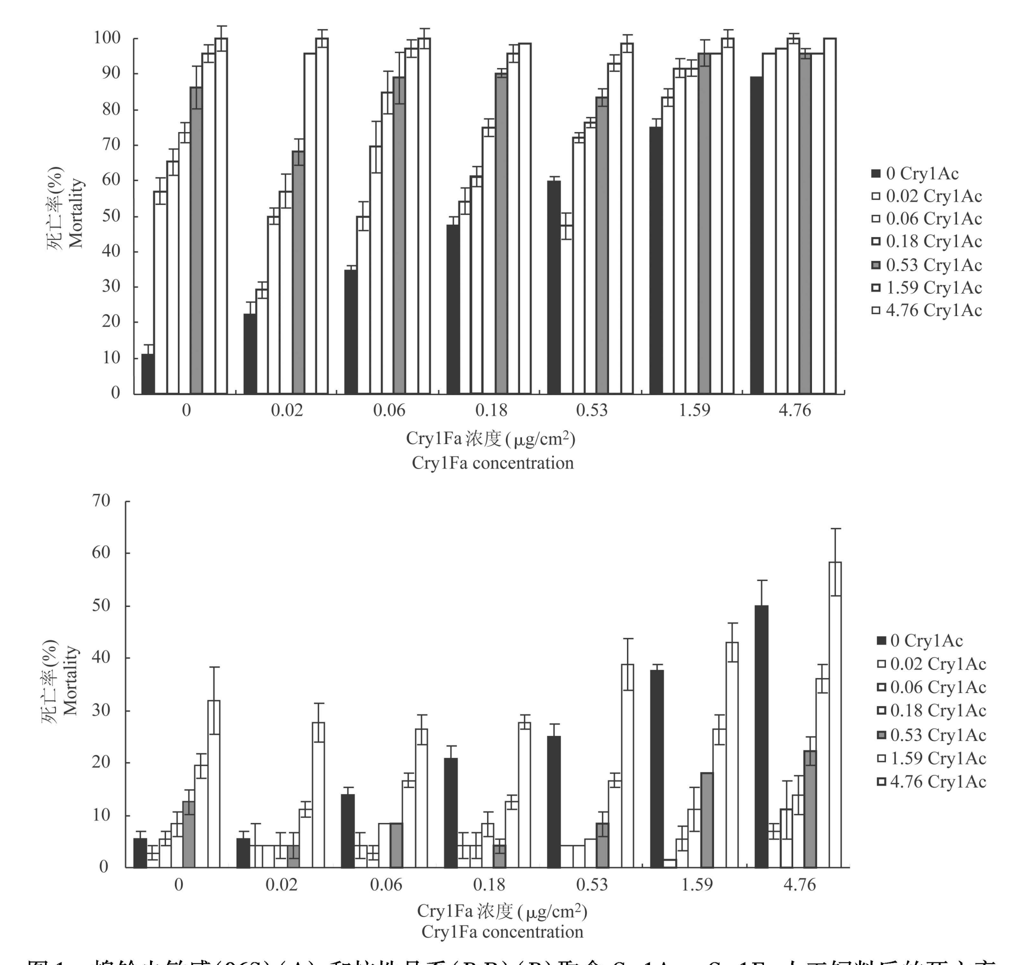


图 1　棉铃虫敏感(96S)(A) 和抗性品系(BtR)(B)取食 Cry1Ac + Cry1Fa 人工饲料后的死亡率

Fig. 1　Mortality of 96S (A) and BtR (B) *Helicoverpa armigera* fed on artificial diets containing Cry1Ac + Cry1Fa

图中数据为平均值 ± 标准误 Data are means ± *SE*.

明显($P = 0.41$, $F = 0.86$, $df = 1$)；但高于单用4.76 μg/cm² Cry1Ac 时的死亡率，差异极显著($P = 0.03$, $F = 10.35$, $df = 1$)。在两种蛋白浓度较低时混用，对 BtR 的毒杀效果较差。

2.3　Cry1Ac 与 Cry1Fa 对抗、感棉铃虫作用效果评价

2.3.1　Cry1Ac 与 Cry1Fa 对敏感棉铃虫的作用效果评价：对于96S，Cry1Ac 和 Cry1Fa 矩阵结构和结果见表 3，应用 D-饱和最优设计试验的相关公式，得到回归方程：$\hat{y} = 9.05 + 2.06x_1 + 0.11x_2 - 2.14x_1^2 - 0.75x_2^2 - 0.58x_1x_2$。

通过分析得到 $F_{回} = 214.03 > F_{0.01} = 5.64$，结果显示回归方程关系显著，能够反映实际情况。回归系数的显著性分析 $t_1 = 13.76 > t_{0.05} = 2.228$；$t_{22} = 2.42 > t_{0.05} = 2.228$；$t_{11} = 6.95 > t_{0.05} = 2.228$；$t_{12} = 3.43 > t_{0.05} = 2.228$；说明 Cry1Ac 和 Cry1Fa 的影响都达到显著水平；二者混用时的交互作用也显著。

偏回归系数绝对值的大小可以反应各个因素的主次，符号的正负反映了因素水平的取值方向。|2.06| > |0.11|，则 b1 > b2；表明一定范围内 Cry1Ac 是影响 96S 死亡率的主要因素。

用 4 个编码值，两两组合，共组成 4 × 4 = 16 个全因子试验，分别代入回归方程式中的 x_1 和 x_2 中，即可模拟出 16 个试验结果(表 4)，其中包括已经实施的 6 个试验在内。根据实际的需要，设杀死 90% 害虫为最优组合，则从 16 个组合中选出满足约束条件的 12 个组合(表 4 中画√者)。从表中结果可以看出，Cry1Ac 和 Cry1Fa 都是在 0.3945 水平时，即浓度为 3.31 μg/cm² 时棉铃虫的理论死亡率最高。

对入选的 12 个组合进行综合分析，确定最优浓度组合，列出最优组合的频数分布表(表 5)进行分析。对入选的 12 个最优组合进行平均数、标准差、标准误、95% 的置信限以及最优浓度范围的计算，最后得出在防治该棉铃虫品系时 Cry1Ac 和 Cry1Fa 的浓度都在 1.41 ~ 2.10 μg/cm² 范围内效果最佳。

表 3 棉铃虫敏感品系 96S 的试验矩阵结构和结果

Table 3 The test matrix structure and result in the susceptible strain 96S of *Helicoverpa armigera*

序号 No.	x_0	x_1	x_2	x_1^2	x_2^2	x_1x_2	y				$\hat{y}$
							Ⅰ	Ⅱ	Ⅲ	平均值 Mean	
1	1	-1	-1	1	1	1	3.289	3.289	3.615	3.398	3.414
2	1	1	-1	1	1	-1	8.719	8.719	8.719	8.719	8.689
3	1	01	1	1	1	01	4.895	4.778	4.778	4.836	4.787
4	1	-0.1315	-0.1315	0.0173	0.0173	0.0173	8.719	8.719	8.719	8.719	8.703
5	1	1	0.3945	1	0.1556	0.3945	8.719	8.719	8.719	8.719	8.665
6	1	0.3945	1	0.1556	1	0.3945	8.719	8.719	8.719	8.719	8.663

表 4 模拟实验结果

Table 4 The results of simulation experiment

编码 Code	组编码 Group code		几率值 Probit	优选组合 Optimization combinations
	x_1	x_2		
1	-1	-1	3.42	
2	-1	-0.1315	4.75	
3	-1	0.3945	5.00	
4	-1	1	4.79	
5	-0.1315	-1	7.80	√
6	-0.1315	-0.1315	8.71	√
7	-0.1315	0.3945	8.71	√
8	-0.1315	1	8.17	√
9	0.3945	-1	8.87	√
10	0.3945	-0.1315	9.52	√
11	0.3945	0.3945	9.34	√
12	0.3945	1	8.64	√
13	1	-1	8.69	√
14	1	-0.1315	9.02	√
15	1	0.3945	8.67	√
16	1	1	7.76	√

表 5 最优组合频数分布

Table 5 The frequency distribution of optimal combinations

编码值及统计项目 Encoded values and statistical projects	Cry1Ac		Cry1Fa	
	次数 Times	频率 Frequency	次数 Times	频率 Frequency
-1	0		0	
0.1315	4	0.333	4	0.333
0.3945	4	0.333	4	0.333
1	4	0.333	4	0.333
合计 Total	12	1	12	1
平均值 Average	-0.42		-0.42	
标准差 Standard deviation	0.48		0.48	
标准误 Standard error	0.14		0.14	
95%置信限 95% confidence limit	-0.73 -0.12		-0.73 -0.12	
最优范围 Optimal range (μg/cm^2)	1.41 -2.10		1.41 -2.10	

$df=12$; $t_{0.05}=2.179$.

2.3.2 Cry1Ac 与 Cry1Fa 对 BtR 的作用效果评价：Cry1Ac 和 Cry1Fa 对 BtR 的作用效果回归方程为：$\hat{y} = 4.50 + 0.43x_1 + 0.37x_2 - 0.091x_1^2 - 0.21x_2^2 + 0.20x_1x_2$。

通过分析得到 $F_{回} = 12.86 > F_{0.01} = 5.64$，结果显示回归方程关系显著，能够反映实际情况。

通过计算得到：$t_1 = 3.03 > t_{0.05} = 2.228$；$t_2 = 2.59 > t_{0.05} = 2.228$，说明 Cry1Ac 和 Cry1Fa 对抗性品系死亡率的作用影响都显著。

$|0.43| > |0.37|$，则 $b1 > b2$，表明一定范围内 Cry1Ac 是影响 BtR 死亡率的主要因素。

由于 2 种蛋白混用对 BtR 的死亡率未达到 90%，不能进一步进行最优配比分析。

3 讨论

Banks 等(2001)研究表明，Cry1Fa 和 Cry1Ac 都可以与烟芽夜蛾 *Heliothis virescens* 110、120 和 170 kDa 的 APN 以及 210 kDa 的分子结合，这可能是该虫对 Cry1Fa 与 Cry1Ac 产生交互抗性的原因。本研究结果表明，对 Cry1Ac 具有 2 194.15 倍抗性的 BtR 棉铃虫对 Cry1Fa 的抗性倍数为 19.98 倍，棉铃虫对 Cry1Fa 和 Cry1Ac 具有一定的交互抗性。有报道表明用相应的 Cry1Fa 的结构域Ⅱ和结构域Ⅲ的相应片段突变 Cry1Ac，可以扩大杀虫谱，使对于草地夜蛾 *Spodoptera frugiperda* 的毒杀效果增强，说明二者还有不同的受体存在(Perlak *et al*., 2001)。本研究结果表明，Cry1Fa 对 96S 的杀虫活性虽然较低，但高浓度的 Cry1Fa 与 Cry1Ac 混用时能显著地提高杀虫效果；对于 BtR，在较高浓度的 Cry1Ac 中加入 Cry1Fa 也可以显著增加棉铃虫的死亡率。我们推测，Cry1Fa 与 Cry1Ac 在棉铃虫体内也存在一些相同和不同的受体，这些工作有待于进一步研究验证。

Ibargutxi 等(2008)按 1∶1，1∶4 和 4∶1 对 Cry1Ac 和 Cry1Fa 进行浓度配比试验，发现二者对其对棉铃虫的毒力没有增效作用。而本研究发现 Cry1Fa 对 96S 具有一定的杀虫活性，低浓度 Cry1Fa 和 Cry1Ac 混合不能提高 Cry1Ac 的杀虫活性，但高浓度(大于 1.587 μg/cm^2)的 Cry1Fa 与 Cry1Ac 混用时，能显著地提高敏感棉铃虫的死亡率。对于 BtR，Cry1Ac 浓度为 4.76 μg/cm^2 时与 Cry1Fa 混用，相对于对照有增效的趋势；但由于抗性品系已经对 Cry1Ac 产生较高水平抗性，即使二者以最高浓度混用，死亡率也仅为 58.33%。另外，图 1(A) 中发现在 Cry1Ac 中加入 0.02 μg/cm^2 Cry1Fa 时，与不加 Cry1Fa 相比，死亡率明显下降。我们推测可能是由于 Cry1Ac 与 Cry1Fa 在棉铃虫上具有相同的结合位点，当加入少量的 Cry1Fa 时，剂量不足以杀死棉铃虫幼虫，但是部分结合位点已与 Cry1Fa 结合，此时可能反而导致棉铃虫死亡率降低；只有当加入的 Cry1Fa 剂量足够高时，才能提高 Cry1Ac 的效果。D-饱和最优回归设计试验结果也表明 Cry1Ac 是决定对抗、感棉铃虫的毒力的主要因素，因此，我们认为 Cry1Ac 与高浓度的 Cry1Fa 混用可以增加对敏感棉铃虫的毒杀效果，但二者混用对治理抗性棉铃虫的效果不理想。

Cry1Fa 作为新蛋白被应用主要是因为其扩大了 Cry1Ac 的杀虫谱，Cry1Fa 对烟芽夜蛾、甜菜夜蛾、粘虫 *Mythimna separata* 和欧洲玉米螟 *Ostrinia nubilalis* 剧毒，对谷实夜蛾 *Helicoverpa zea* 低毒，而 Cry1Ac 对于烟芽夜蛾、粘虫、棉铃虫和欧洲玉米螟剧毒，但对于甜菜夜蛾低毒(Chambers *et al*., 1991)。Ibargutxi 等(2008)研究表明，虽然转 Cry1Ac 和 Cry1Fa 的作物对治理棉铃虫的效果不佳，但可以提高对棉斑实蛾 *Earias insulana* 的杀虫活性。根据本研究结果，我们认为，尽管 Cry1F + Cry1A 作物扩大了杀虫谱，但棉铃虫对这两种蛋白存在交互抗性，而且这两种蛋白混用对治理抗 Cry1Ac 棉铃虫的效果不理想，因此不建议在中国种植表达 Cry1F + Cry1A 的棉花。

参考文献(References)

Ballester V, Granero F, Tabashnik BE, Malvar T, Ferre J, 1999. Integrative model for binding of *Bacillus thuringiensis* toxins in susceptible and resistant larvae of the diamondback moth (*Plutella xylostella*). *Appl. Environ. Microbiol*., 65(4): 1413–1419.

Banks DJ, Jurat-Fuentes JL, Dean DH, Adang MJ, 2001. *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac and Cry1Fa δ-endotoxin binding to a novel 110 kDa aminopeptidase in *Heliothis virescens* is not *N*-acetylgalactosamine mediated. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 31(9): 909–918.

Bates SL, Zhao JZ, Roush RT, Shelton AM, 2005. Insect resistance management in GM crops: past, present and future. *Nature Biotechnol*., 23: 57–62.

Betz FS, Hammond BG, Fuchs RL, 2000. Safety and advantages of *Bacillus thuringiensis*-protected plants to control insect pests. *Regul. Toxicol. Pharmacol*., 32: 156–173.

Brookes G, Barfoot P, 2010. GM Crops: Global Socio-Economic and Environmental Impacts 1996–2009. PG Economics Ltd., UK.

Chambers JA, Jelen A, Gilbert MP, Jany CS, Johnson TB, Gawron-

Burke C, 1991. Isolation and characterization of a novel insecticidal crystal protein gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*. *Journal of Bacteriology*, 173(13): 3966 – 3976.

Choudhary B, Gaur K, 2010. Bt Cotton in India: A Country Profile. ISAAA Series of Biotech Crop Profiles. ISAAA: Ithaca, NY.

Ding XQ, 1986. Regression Design of Agricultural Application. Jilin Science and Technology Press, Changchun. [丁希泉, 1986. 农业应用回归设计. 长春: 吉林科学技术出版社]

Gouffon C, Van Vliet A, Van Rie J, Jansens S, Jurat-Fuentes JL, 2011. Binding sites for *Bacillus thuringiensis* Cry2Ae toxin on heliothine brush border membrane vesicles are not shared with Cry1A, Cry1F, or Vip3A toxin. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(10): 3182 – 3188.

Granero F, Ballester V, Ferré J, 1996. *Bacillus thuringiensis* crystal protein Cry1Ab and Cry1Fa share a high affinity binding site in *Plutella xylostella* (L.). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 224: 779 – 783.

Hernández CS, Ferré J, 2005. Common receptor for *Bacillus thuringiensis* toxins Cry1Ac, Cry1Fa, and Cry1Ja in *Helicoverpa armigera*, *Helicoverpa zea*, and *Spodoptera exigua*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(9): 5627 – 5629.

Hernández-Rodríguez CS, Vliet AV, Bautsoens N, Rie JV, Ferré J, 2008. Specific binding of *Bacillus thuringiensis* Cry2A insecticidal proteins to a common site in the midgut of *Helicoverpa* species. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(24): 7654 – 7659.

Ibargutxi MA, Muñoz D, Ruíz I, Escudero IR, Caballero P, 2008. Interactions between Cry1Ac, Cry2Ab, and Cry1Fa *Bacillus thuringiensis* toxins in the cotton pests *Helicoverpa armigera* (Hübner) and *Earias insulana* (Boisduval). *Biological Control*, 47(1): 89 – 96.

James C, 2010. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops. ISAAA Brief No. 42. ISAAA: Ithaca, NY.

Jurat-Fuentes JL, Adang MJ, 2001. Importance of Cry1 δ-endotoxin domain Ⅱ loops for binding specificity in *Heliothis virescens* (L.). *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 323 – 329.

Jurat-Fuentes JL, Gould FL, Adang MJ, 2002. Altered glycosylation of 63- and 68-kilodalton microvillar proteins in *Heliothis virescens* correlates with reduced Cry1 toxin binding, decreased pore formation, and increased resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1 toxins. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(11): 5711 – 5717.

Kleter GA, Bhula R, Bodnaruk K, Carazo E, Felsot AL, Harris CA, Katayama A, Kuiper HA, Racke KD, Rubin B, Shevah Y, Stephenson GR, Tanaka KJ, Unsworth J, Wauchope RD, Wong SS, 2007. Altered pesticide use on transgenic crops and the associated general impact from an environmental perspective. *Pest Management Science*, 63(11): 1107 – 1115.

Liang GM, Tan WJ, Guo YY, 1999. An improvement in the technique of artificial rearing cotton bollworm. *Plant Protection*, 25(2): 15 – 17. [梁革梅, 谭维嘉, 郭予元, 1999. 人工饲养棉铃虫技术的改进. 植物保护, 25(2): 15 – 17]

Liang GM, Wu KM, Yu HK, Li KK, Li XF, Guo YY, 2008. Changes of inheritance mode and fitness in *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) along with its resistance evolution to Cry1Ac toxin. *Journal of Invertebrate Pathology*, 97: 142 – 149.

Perlak FJ, Oppenhuizen M, Gustafson K, Voth R, Sivasupramaniam S, Heering D, Carey B, Ihrig RA, Roberts JK, 2001. Development and commercial use of Bollgard® cotton in the USA – early promises versus today's reality. *The Plant Journal*, 27(6): 489 – 501.

Rajamohan F, Cotrill JA, Gould F, Dean DH, 1996. Role of domain Ⅱ, loop 2 residues of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab δ-endotoxin in reversible and irreversible binding to *Manduca sexta* and *Heliothis virescens*. *J. Biol. Chem.*, 271: 2390 – 2396.

Staples N, Ellar D, Crickmore N, 2001. Cellular localization and characterization of the *Bacilllus thuringiensis* Orf2 crystallization factor. *Current Microbiology*, 42: 388 – 392.

Tabashnik BE, Carrière Y, 2010. Field-evolved resistance to Bt cotton: bollworm in the U. S. and pink bollworm in India. *Southwestern Entomologist*, 35(3): 417 – 424.

Tabashnik BE, Johnson KW, Engleman JT, 2000. Cross-resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ja in a strain of diamondback moth adapted to artificial diet. *Applied and Environmental Microbiology*, 76: 81 – 83.

Tabashnik BE, Liu YB, Malvar T, Heckel DG, Masson L, Ballester V, Granero F, Mensua JL, Ferre J, 1997. Global variation in the genetic and biochemical basis of diamondback moth resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94: 12780 – 12785.

Wang ZY, Wu Y, He KL, Bai SX, 2007. Effects of transgenic Bt maize pollen on longevity and fecundity of *Trichogramma ostriniae* in laboratory conditions. *Bulletin of Insectology*, 60(1): 49 – 55.

Wu KM, Lu YH, Feng HQ, Jiang YY, Zhao JZ, 2008. Suppression of cotton bollworm in multiple crops in China in areas with Bt toxin-containing cotton. *Science*, 321: 1676 – 1678.

Yu HL, Li YH, Wu KM, 2011. Risk assessment and ecological effects of transgenic *Bacillus thuringiensis* crops on non-target organisms. *Journal of Integrative Plant Biology*, 53(7): 520 – 538.

Zhang YC, 1997. Application of saturated D-optimal design method in the agricultural experiment. *Chinese Potato Journal*, 11(3): 171 – 176. [张永成, 1997. 饱和 D 最优设计方法在农业试验中的应用. 马铃薯杂志, 11(3): 171 – 176]

(责任编辑: 赵利辉)